



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 293 139 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 Q 1/68
C 12 N 15/11

4

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 Q / 330 099 4

(22) 29.06.89

(44) 22.08.91

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 8, O - 1086 Berlin, DE

(72) Krüger, Detlev, Prof. Dr. sc. med., DE; Butkus, Viktoras, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., SU; Reuter, Monika, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., DE; Pein, Claus-Dietmar, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DE; Hansen, Sigrid, DE; Schroeder, Cornelia, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DE

(73) Humboldt-Universität zu Berlin, Bereich Medizin (Charité), O - 1040 Berlin, DE

(54) Verfahren zur Charakterisierung bestimmter DNA-Sequenzen

(55) Molekularbiologie; Gentechnik; DNA; DNA-Methylierung; Oligonukleotid-Duplexe; Restriktionsendonuklease; Dcm-Methylierung; EcoRII; BstNI; MvaI

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Charakterisierung bestimmter DNA-Sequenzen. Die Erfindung findet auf den Gebieten der Molekularbiologie und Gentechnik Anwendung. Ihr Wesen besteht darin, die DNA-Moleküle, deren nichtmethylierte Erkennungsorte durch eine entsprechende Restriktionsendonuklease geschnitten werden sollen, im Reaktionsgemisch mit einer zweiten, unmethylierten DNA-Species (vor allem Oligonukleotid-Duplexe, die den Erkennungsort enthalten) zu inkubieren. Auf diese Weise wird die methylierungsanzeigende Restriktionsendonuklease befähigt, alle unmethylierten Erkennungsorte zu schneiden, während spezifisch methylierte Erkennungsorte nach wie vor nicht angegriffen werden. Als sehr günstig erweist sich dieses Verfahren für den Nachweis der Dcm-Methylierung mit Hilfe der Restriktionsendonuklease EcoRII.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Charakterisierung bestimmter DNA-Sequenzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch Einsatz isochizomerer Restriktionsendonukleasen unter Zusatz einer zweiten DNA-Species die spezifische Methylierung der DNA-Orte bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als zweite DNA-Species biologisch replizierte DNA-Moleküle, Teile solcher Moleküle oder Oligonukleotid-Duplexe eingesetzt werden, die Erkennungsorte für die entsprechende Restriktionsendonuklease besitzen und keine schützende Methylierung tragen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß vorrangig die natürliche Dcm-Methylierung der DNA, die im Vorliegen von 5-Methylcytosin in der internen Position der Nukleotidsequenz 5'-CCA/TGG besteht, durch die Restriktionsendonuklease *EcoRII* sicher nachgewiesen wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis der biologischen Methylierung von DNA in spezifischen Nukleotidsequenzen. Sie ist somit anwendbar in der molekularbiologischen Forschung und in der Gentechnologie.

Charakterisierung des bekannten Standes der Technik

Die biologische Methylierung bestimmter Nukleotidsequenzen in DNA-Molekülen, die zur Entstehung von 6-Methyladenin, 5-Methylcytosin oder N4-Methylcytosin in den entsprechenden DNA-Erkennungsorten führt, verändert die Wechselwirkung der DNA mit Proteinen. Sie hat wichtige funktionelle Konsequenzen für eine Vielzahl von molekularbiologischen Regulationsprozessen und verändert die Empfindlichkeit des DNA-Ortes gegenüber dem Schneiden durch bestimmte Restriktionsendonukleasen (KRÜGER, Biol. Zentralblatt 107 [1988] 257-266).

Eine bevorzugte Methode zum Nachweis der spezifischen DNA-Methylierung besteht in der vergleichenden Verdauung der DNA mit solchen isochizomeren Restriktionsendonukleasen, die durch die spezifische Methylierung des DNA-Ortes in unterschiedlichem Maße gehemmt werden. Beispielsweise wird die Methylierung des internen Cytosins in der Sequenz 5'-CCGG-3' zu 5-Methylcytosin mit Hilfe des Paares isochizomerer Restriktionsendonukleasen *MspI* und *HpaII* nachgewiesen, die beide diesen DNA-Ort erkennen. Nur das zweite Enzym wird durch die beschriebene Methylierung gehemmt, und zeigt diese somit an. Die Dcm-Methylierung (Methylierung des internen Cytosins in der Sequenz 5'-CCA/TGG-3' zu 5-Methylcytosin) wird durch vergleichende Verdauung mit den isochizomeren Restriktionsendonukleasen *BstNI* oder *MvaI* (die durch diese Methylierung nicht am Schneiden gehindert werden) und *EcoRII* (die durch die Methylierung gehemmt wird und diese somit anzeigt) nachgewiesen (Mc CLELLAND und NELSON, Gene 74 [1988] 291-304).

Die Aussagefähigkeit der beschriebenen Methode wird jedoch durch den Befund eingeschränkt, daß bestimmte DNA-Species durch methylierungsanzeigende Restriktionsendonukleasen schlecht geschnitten werden, obwohl sie gar nicht die spezifische Methylierung tragen. Dies führt zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse, daß Methylierungen der DNA angenommen werden, die tatsächlich gar nicht vorhanden sind. Beispielsweise sind die DNAs der Bakterienviren T3 und T7 gegenüber *EcoRII*-Verdauung resistent, obwohl sie nicht spezifisch methyliert sind (KRÜGER et al., Eur. J. Biochem. 150 [1985] 323-330).

Die vorliegende Erfindung schafft eine Möglichkeit, um eine sichere und aussagekräftige Bestimmung der spezifischen DNA-Methylierung unter Nutzung isochizomerer Restriktionsendonukleasen praktikabel zu machen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, das Vorliegen spezifischer Methylierungen in DNA-Molekülen sicherer und aussagefähiger als bisher zu bestimmen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, nach dem es möglich wird, bestimmte DNA-Sequenzen hinsichtlich ihrer Methylierung zu charakterisieren. Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß eine zweite DNA-Species (vor allem Oligonukleotid-Duplexe), die Erkennungsorte für die entsprechende Restriktionsendonuklease enthalten, zum Inkubationsgemisch von zu untersuchender DNA und Restriktionsendonuklease gegeben werden. Die Inkubation erfolgt unter den für die jeweilige Restriktionsendonuklease gültigen (Puffer- und Kofaktorkonzentrationen, pH-Wert, Temperatur, Zeitdauer der Inkubation) Bedingungen (MANIATIS et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1982). Überraschenderweise wird damit eine a-priori-Resistenz unmethylierter Erkennungsorte in der zu untersuchenden DNA aufgehoben, während spezifisch methylierte Erkennungsorte auch unter diesen Bedingungen nicht durch die Restriktionsendonuklease geschnitten werden. Damit wird erstmals eine sichere Unterscheidung zwischen spezifisch methylierten und unmethylierten DNA-Erkennungsorten für eine bestimmte methylierungsanzeigende Restriktionsendonuklease möglich.

Als besonders vorteilhaft hat sich dieses Verfahren im Falle des Nachweises der Dcm-Methylierung mit Hilfe der Restriktionsendonuklease EcoRII erwiesen. Eine Reihe von DNA-Species ist a priori gegenüber dieser Restriktionsendonuklease vollständig oder partiell resistent (z.B. DNAs der Bakterienviren T3, T7, M13 und des M13-abgeleiteten gentechnischen Vektors mp18). Unter Nutzung der vorliegenden Erfindung kann eine solche a-priori-Resistenz ausgeschaltet und die tatsächliche spezifische Methylierung nachgewiesen werden.

Ausführungsbeispiel

Die DNA des Bakterienvirus M13 besitzt 2 und des von M13 abgeleiteten Klonierungsvektors mp18 5 Erkennungsorte für die Methylase Dcm (YANISCH-PERRON et al., Gene 33 [1985] 103-119). Diese Erkennungsorte werden durch die Restriktionsendonukleasen BstNI und MvaI normal geschnitten. Auch nach Replikation der DNA in Dcm-negativen Wirtszellen, wodurch jede Dcm-Methylierung ausgeschlossen ist, sind die M13-DNA und die mp18-DNA hochgradig resistent gegen die isochimere Restriktionsendonuklease EcoRII (KRÜGER et al., unpublizierte Daten). Inkubation solcher M13- bzw. mp18-DNAs mit Oligonukleotidduplexen, die die Dcm-Erkennungssequenz besitzen, führt in Gegenwart von EcoRII zur spezifischen Spaltung aller Dcm-Erkennungsorte in der M13-DNA und in der mp18-DNA. In einem Restriktionsansatz werden 300ng M13- bzw. mp18-DNA, 40ng des 14 Basenpaare langen Oligonukleotidduplexes der Sequenz 5'-GCCAA CCTGG CTCT-3' und 3 Einheiten EcoRII (Bethesda Research Laboratories) in 20µl Reaktionspuffer mit den Endkonzentrationen 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 50mM KCl, 50mM NaCl, 6mM MgCl₂, 1mM DTT bei einer Temperatur von 37°C für 60 min inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion (5 min Inkubation bei 65°C) erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Sichtbarmachung der Fragmente nach Äthidiumbromidbehandlung des Gels und UV-Bestrahlung. Unter den gleichen Bedingungen kommt es bei Inkubation von Dcm-spezifisch methylierter DNA (z.B. pBR322 Dcm⁺ oder M13 Dcm⁺ DNA) mit EcoRII in Gegenwart des Oligonukleotidduplexes nicht zur Stimulierung der DNA-Verdauung, d.h. Oligonukleotidzugabe vermittelt nur die EcoRII-abhängige Spaltung unmethylierter DNA-Erkennungsorte.